

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

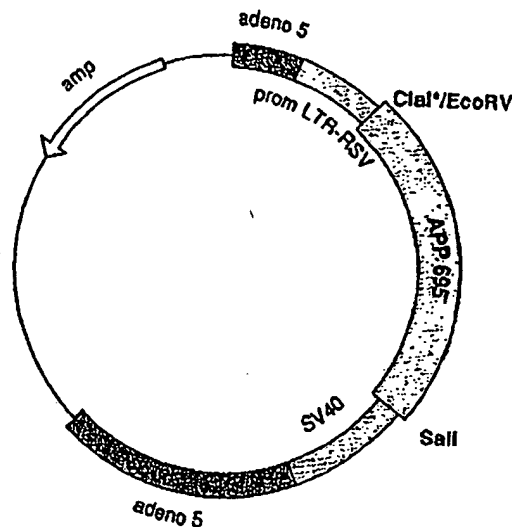
IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCTORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 15/86, A01K 67/027, C07K 14/47, C12N 15/12, 7/02, G01N 33/50	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 95/22616 (43) Date de publication internationale: 24 août 1995 (24.08.95)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR95/00187 (22) Date de dépôt international: 17 février 1995 (17.02.95) (30) Données relatives à la priorité: 94/01922 21 février 1994 (21.02.94) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): RHONE-POULENC RORER S.A. [FR/FR]; 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): BARNEOUD, Pascal [FR/FR]; 1, avenue Anatole-France, F-94600 Choisy-le-Roi (FR). DELAERE, Pia [BE/FR]; 108 bis, boulevard Auguste-Blanqui, F-75013 Paris (FR). MERCKEN, Luc [BE/FR]; 14, avenue de Marinville, F-94100 Saint-Maur (FR). PER- RICAUDET, Michel [FR/FR]; 31, rue de Chartres, F-28320 Ecrosnes (FR). PRADIER, Laurent [FR/FR]; 5 bis, rue d'Alésia, F-75014 Paris (FR). VIGNE, Emmanuelle [FR/FR]; 60, rue Jean-le-Galleu, F-94200 Ivry-sur-Seine (FR). (74) Mandataire: BECKER, Philippe; Rhone-Poulenc Rorer S.A., Direction Brevets, 20, avenue Raymond-Aron, F-92160 Antony (FR).	(81) Etats désignés: AM, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CZ, EE, FI, GE, HU, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SI, SK, TJ, TT, UA, US, UZ, VN, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), brevet ARIPO (KE, MW, SD, SZ, UG). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>	

(54) Title: ANIMAL MODEL OF THE ALZHEIMER DISEASE, PREPARATION AND UTILISATIONS**(54) Titre:** MODELE ANIMAL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER, PREPARATION ET UTILISATIONS**(57) Abstract**

The present invention relates to an animal model of the Alzheimer disease, its preparation by means of recombinant viruses, and its utilisation particularly for eliciting active compounds.

(57) Abrégé

La présente invention concerne un modèle animal de la maladie d'Alzheimer, sa préparation au moyen de virus recombinants, et son utilisation, notamment pour la mise en évidence de composés actifs.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

MODELE ANIMAL DE LA MALADIE D'ALZHEIMER
PREPARATION ET UTILISATIONS

La présente invention concerne un modèle animal de la maladie d'Alzheimer, sa préparation au moyen de virus recombinants, et son utilisation, notamment pour la mise en évidence de composés actifs. Plus particulièrement, elle concerne des adénovirus recombinants comportant une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde, leur préparation et leur utilisation pour la préparation de modèles animaux de la maladie d'Alzheimer. Elle concerne aussi l'utilisation de ces modèles animaux, notamment pour la mise en évidence de composés actifs sur la maladie d'Alzheimer, ainsi que les composés identifiés.

La maladie d'Alzheimer atteint actuellement 10 % des personnes âgées de plus de 65 ans, et 20 % au delà de 80 ans. Les estimations prévoient pour l'an 2000, 5 à 8 millions de cas aux Etats-Unis et 23 millions dans le monde. Cette démence sénile est caractérisée par la présence post-mortem de plaques séniles (comportant un dépôt amyloïde central) et de dégénérescences neurofibrillaires. Bien que l'étiologie de la maladie ne soit pas encore entièrement connue, la formation des dépôts amyloïdes semble correspondre à un événement précoce et déterminant.

Le composant majoritaire de ces dépôts est le peptide BA4 de 39 à 43 acides aminés dont le précurseur, désigné précurseur du peptide amyloïde (APP pour "Amyloid Precursor Protein"), a été cloné et séquencé (Kang et al., Nature 325 (1987) 733). Depuis, différentes isoformes du précurseur du peptide amyloïde ont été identifiées, correspondant à un épissage alternatif de l'ARN prémessager (Ponte et al., Nature 331 (1988) 525). De plus, l'identification récente dans certaines formes familiales de la maladie d'Alzheimer de mutations dans l'APP a renforcé l'implication de cette protéine dans l'étiologie de la maladie.

Actuellement, l'étude de la maladie d'Alzheimer et la mise au point de composés actifs sur cette maladie sont extrêmement difficiles, notamment en raison de l'absence de modèles animaux de cette pathologie. Les seuls modèles disponibles actuellement reposent sur l'étude in vitro de l'agrégation du peptide β amyloïde ou de la toxicité de ce peptide sur cellules en culture. Mais ce type de modèle ne peut être prédictif d'une activité in vivo, en particulier pour une pathologie aussi complexe que la maladie d'Alzheimer. La présente invention apporte une solution à ce problème. Elle décrit en effet la préparation de modèles animaux de la maladie d'Alzheimer, ainsi que la possibilité d'utiliser ces modèles pour la mise en évidence de composés actifs sur cette pathologie. Les modèles selon l'invention ont été préparés au moyen de vecteurs

5 viraux, plus particulièrement de vecteurs dérivés des adénovirus, contenant une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde. La demanderesse a en effet montré qu'il est possible de construire des adénovirus recombinants contenant une telle séquence codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde, d'administrer ces adénovirus recombinants à un animal, que cette administration permet une expression de cette séquence dans ledit animal et en particulier dans le système nerveux dudit animal, et que l'expression obtenue permet d'induire sur ledit animal certaines caractéristiques anatomohistologiques et/ou comportementales de la maladie d'Alzheimer.

10 Un premier objet de la présente invention réside donc dans un adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde.

Il a été montré dans la demande copendante n° PCT/EP93/02519 que les adénovirus pouvaient être utilisés pour le transfert de gènes in vivo dans le système nerveux. Les adénovirus recombinants de la présente invention sont particulièrement avantageux puisqu'ils sont capables d'induire l'apparition de symptômes de la maladie d'Alzheimer chez l'animal. En particulier, de manière surprenante, les adénovirus de l'invention sont capables d'induire l'apparition de caractéristiques anatomohistologiques et/ou comportementales de la maladie d'Alzheimer, ce qui permet la réalisation d'un modèle physiopathologique animal particulièrement avantageux pour l'étude et la mise au point d'un traitement de cette maladie.

Les propriétés particulièrement avantageuses des modèles de l'invention découlent essentiellement du virus utilisé (adénovirus défectif, délété de certaines régions virales), du promoteur utilisé pour l'expression de la séquence codant pour l'APP (promoteur viral de préférence), et des méthodes d'administration dudit vecteur, permettant l'expression efficace et dans les tissus appropriés de la séquence APP.

Préférentiellement, on utilise dans le cadre de la présente invention un adénovirus dépourvu des régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible. Les adénovirus défectifs selon l'invention sont donc incapables de se répliquer de façon autonome dans la cellule cible.

Généralement, le génome des adénovirus défectifs utilisés dans le cadre de la présente invention est dépourvu au moins des séquences nécessaires à la réplication dudit virus dans la cellule infectée. Ces régions peuvent être soit éliminées (en tout ou

en partie), soit rendues non-fonctionnelles, soit substituées par d'autres séquences et notamment par la séquence codant pour une forme du précurseur.

Préférentiellement, le virus déficient conserve néanmoins les séquences de son génome qui sont nécessaires à l'encapsulation des particules virales.

- 5 Il existe différents sérotypes d'adénovirus, dont la structure et les propriétés varient quelque peu. Parmi ces sérotypes, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention les adénovirus humains de type 2 ou 5 (Ad 2 ou Ad 5) ou les adénovirus d'origine animale. Parmi les adénovirus d'origine animale utilisables dans le cadre de la présente invention on peut citer les adénovirus d'origine canine, bovine, 10 murine, (exemple : Mav1, Beard et al., Virology 75 (1990) 81), ovine, porcine, aviaire ou encore simienne (exemple : SAV) (voir demande FR 93 05954). De préférence, l'adénovirus d'origine animale est un adénovirus canin, plus préférentiellement un adénovirus obtenu à partir d'une souche CAV2 [souche manhattan ou A26/61 (ATCC VR-800) par exemple]. Il peut également s'agir d'un adénovirus d'origine mixte 15 (contenant des séquences humaines et des séquence animales).

Dans un mode préféré, l'adénovirus de l'invention est un adénovirus humain de type Ad2 ou Ad5.

Dans un autre mode préféré, l'adénovirus de l'invention est un adénovirus canin de type CAV-2.

- 20 Comme indiqué ci-dessus, les adénovirus de l'invention portent une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde. Le terme précurseur du peptide amyloïde désigne au sens de la présente invention tout peptide capable de maturer en peptide amyloïde. De préférence, le précurseur du peptide amyloïde selon l'invention est capable de maturer en une forme du peptide amyloïde 25 BA4 ou d'un variant de celle-ci. De manière particulièrement avantageuse, il doit pouvoir maturer en une des formes comprenant 39 à 43 acides aminés du peptide BA4.

- De préférence, le précurseur du peptide amyloïde au sens de l'invention est représenté par tout variant naturel ou artificiel de l'APP. Comme indiqué ci-avant, différents variants naturels de l'APP existent, ainsi que certaines formes mutées. Parmi 30 les formes naturelles du précurseur, on peut citer plus particulièrement les isoformes APP695, APP751 et APP770. Par ailleurs, des variants artificiels de l'APP peuvent être utilisés, notamment des variants contenant une région N-terminale tronquée. En effet, dans les variants naturels de l'APP, et en particulier pour l'isoforme de l'APP à

695 acides aminés, le peptide amyloïde mature est situé au centre de la molécule, au niveau des résidus 597 à 638 (Kang et al., Nature 325 (1987) 733). Dans un mode de réalisation avantageux de l'invention, on utilise une séquence d'ADN codant pour le précurseur du peptide amyloïde tronqué dans sa région N-terminale. Plus
5 préférentiellement, on utilise une séquence d'ADN codant pour le précurseur du peptide amyloïde tronqué de la région N-terminale précédant le peptide amyloïde [variant A4CT ou SpA4CT (précédé d'une séquence signal)].

Préférentiellement, l'adénovirus de l'invention comprend une séquence d'ADN codant pour tout variant naturel ou synthétique de l'APP.

10 Encore plus préférentiellement, l'adénovirus de l'invention comprend une séquence d'ADN codant pour l'APP695, l'APP751 ou l'APP770.

Dans un mode particulier, l'adénovirus de l'invention comprend une séquence d'ADN codant pour le précurseur du peptide amyloïde tronqué dans sa région N-terminale, tel que notamment les variants A4CT ou SpA4CT.

15 Par ailleurs, il est entendu que la séquence d'ADN peut être également toute séquence homologue à celles décrites ci-dessus, codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde tel que défini ci-avant. De telles séquences homologues peuvent en particulier être obtenues par des techniques connues de l'homme du métier, telles que la mutation, délétion, addition et/ou hybridation avec les séquences décrites ci-
20 dessus. Parmi les formes mutées, on peut citer à titre d'exemple les mutations observées dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer.

Avantageusement, la séquence codant pour le précurseur du peptide amyloïde est placée sous le contrôle de signaux d'expression hétérologues permettant son expression dans les cellules infectées. Au sens de la présente invention, on entend par
25 signaux d'expression hétérologues des signaux différents de ceux naturellement responsables de l'expression du précurseur du peptide amyloïde. Il peut s'agir en particulier de séquences responsables de l'expression d'autres protéines, ou de séquences synthétiques. Notamment, il peut s'agir de séquences promotrices de gènes eucaryotes ou viraux. Par exemple, il peut s'agir de séquences promotrices issues du
30 génome de la cellule que l'on désire infecter. De même, il peut s'agir de séquences promotrices issues du génome d'un virus, y compris l'adénovirus utilisé.

Préférentiellement, la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux d'expression permettant son expression dans le système nerveux d'un animal, choisis de préférence parmi les promoteurs d'origine virale.

Plus particulièrement, on peut citer par exemple les promoteurs E1A, MLP,
5 CMV, LTR-RSV, etc.

En outre, les séquences d'expression peuvent être modifiées par addition de séquences d'activation de régulation, ou permettant une expression tissu-spécifique. Il peut en effet être particulièrement intéressant d'utiliser des signaux d'expression actifs spécifiquement ou majoritairement dans les cellules nerveuses, de manière à ce que la
10 séquence d'ADN ne soit exprimée et ne produise son effet que lorsque le virus a effectivement infecté une cellule nerveuse. A cet égard, on peut citer par exemple le promoteur de la GFAP.

Dans un mode particulièrement avantageux, l'adénovirus de l'invention comprend une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide
15 amyloïde sous contrôle du LTR-RSV. Comme le montrent les exemples, cette construction permet en effet d'exprimer de manière très efficace et durable ladite séquence d'ADN dans le système nerveux des animaux, et d'induire l'apparition de symptômes facilement détectables de la maladie d'Alzheimer.

Les adénovirus recombinants défectifs selon l'invention peuvent être préparés
20 par toute technique connue de l'homme du métier (Levrero et al., Gene 101 (1991) 195, EP 185 573; Graham, EMBO J. 3 (1984) 2917). En particulier, ils peuvent être préparés par recombinaison homologue entre un adénovirus et un plasmide portant entre autre la séquence d'ADN. La recombinaison homologue se produit après co-transfection desdits adénovirus et plasmide dans une lignée cellulaire appropriée. La
25 lignée cellulaire utilisée doit de préférence (i) être transformable par lesdits éléments, et (ii), comporter les séquences capables de compléter la partie du génome de l'adénovirus défectif, de préférence sous forme intégrée pour éviter les risques de recombinaison. A titre d'exemple de lignée, on peut mentionner la lignée de rein embryonnaire humain 293 (Graham et al., J. Gen. Virol. 36 (1977) 59) qui contient
30 notamment, intégrée dans son génome, la partie gauche du génome d'un adénovirus Ad5 (12 %). Des stratégies de construction de vecteurs dérivés des adénovirus ont également été décrites dans les demandes n° FR 93 05954 et FR 93 08596.

Ensuite, les adénovirus qui se sont multipliés sont récupérés et purifiés selon les techniques classiques de biologie moléculaire, comme illustré dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un adénovirus tel que défini ci-avant pour la préparation d'un modèle animal de la maladie d'Alzheimer.

- 5 L'invention concerne également tout modèle animal de la maladie d'Alzheimer comprenant un mammifère non-humain contenant un adénovirus recombinant tel que défini ci-avant.

Comme indiqué ci-avant, l'utilisation des vecteurs décrits ci-avant permet de manière tout à fait avantageuse de préparer des modèles animaux de la maladie
10 d'Alzheimer fiables et particulièrement simples à utiliser. Plus particulièrement, dans ces modèles, l'adénovirus recombinant est administré par injection et, encore plus préférentiellement, par injection directe dans le système nerveux central. Ce mode d'administration est particulièrement avantageux puisqu'il permet au vecteur d'infecter rapidement et efficacement les cellules nerveuses, pratiquement sans être disséminé
15 dans le reste de l'organisme.

L'injection directe dans le système nerveux central est réalisée de préférence au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique. L'emploi de ce type d'appareil permet en effet de cibler avec une grande précision le site d'injection, comme le montrent les exemples.

- 20 Avantageusement, l'adénovirus recombinant est administré sous forme de solutions, et en particulier de solutions stériles, isotoniques, ou de compositions sèches, notamment lyophilisées, qui, par addition selon le cas d'eau stérilisée ou de sérum physiologique, permettent la constitution de solutés injectables.

Les doses d'adénovirus recombinant déficient utilisées pour l'injection et le
25 nombre d'injections peuvent être adaptées en fonction de différents paramètres, et notamment en fonction du mode d'administration utilisé, de l'animal utilisé, etc. D'une manière générale, les adénovirus recombinants selon l'invention sont formulés et administrés sous forme de doses comprises entre 10^4 et 10^{14} pfu/ml, et de préférence 10^6 à 10^{10} pfu/ml. Le terme pfu ("plaque forming unit") correspond au pouvoir
30 infectieux d'une solution de virus, et est déterminé par infection d'une culture cellulaire appropriée, et mesure, généralement après 48 heures, du nombre de plages de cellules

infectées. Les techniques de détermination du titre pfu d'une solution virale sont bien documentées dans la littérature.

Le nombre d'injections peut varier selon les cas, entre 1 et 5.

De préférence, les adénovirus recombinants sont administrés à un animal âgé de 1 à 25 semaines, de préférence de 4 à 20 semaines. Plus préférentiellement encore, l'injection est réalisée sur des animaux de 8 à 10 semaines.

Le mammifère non-humain utilisé pour la préparation des modèles selon l'invention est avantageusement choisi parmi les rongeurs. Plus préférentiellement, il s'agit d'une souris, d'un rat, d'un cobaye ou d'un lapin. Toutefois, d'autres animaux, comme le lémurien, peuvent également être utilisés.

La présente invention décrit également un procédé de préparation d'un modèle animal de la maladie d'Alzheimer selon lequel on administre, à un mammifère non-humain, un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde.

La présente invention a également pour objet un procédé de mise en évidence de composés ou compositions actifs vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer selon lequel on administre ledit composé ou ladite composition à un animal tel que décrit ci-dessus, et on détermine son activité sur les effets induits par l'adénovirus recombinant.

Avantageusement, le composé ou la composition est administré par voie orale, topique, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire, transdermique, etc.

L'invention comprend aussi tout composé ou composition actif vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer, obtenu par le procédé décrit ci-avant.

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

Légende des figures

Figure 1 : Représentation du vecteur pXL2244

Figure 2 : Représentation du vecteur pSh-Ad-APP695

Techniques générales de biologie moléculaire

Les méthodes classiquement utilisées en biologie moléculaire telles que les extractions préparatives d'ADN plasmidique, la centrifugation d'ADN plasmidique en gradient de chlorure de césium, l'électrophorèse sur gels d'agarose ou d'acrylamide, la purification de fragments d'ADN par électroélution, les extraction de protéines au phénol ou au phénol-chloroforme, la précipitation d'ADN en milieu salin par de l'éthanol ou de l'isopropanol, la transformation dans *Escherichia coli*, etc ... sont bien connues de l'homme de métier et sont abondamment décrites dans la littérature [Maniatis T. et al., "Molecular Cloning, a Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1982; Ausubel F.M. et al. (eds), "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons, New York, 1987].

Les plasmides de type pBR322, pUC et les phages de la série M13 sont d'origine commerciale (Bethesda Research Laboratories).

Pour les ligatures, les fragments d'ADN peuvent être séparés selon leur taille par électrophorèse en gels d'agarose ou d'acrylamide, extraits au phénol ou par un mélange phénol/chloroforme, précipités à l'éthanol puis incubés en présence de l'ADN ligase du phage T4 (Biolabs) selon les recommandations du fournisseur.

Le remplissage des extrémités 5' proéminentes peut être effectué par le fragment de Klenow de l'ADN Polymérase I d'*E. coli* (Biolabs) selon les spécifications du fournisseur. La destruction des extrémités 3' proéminentes est effectuée en présence de l'ADN Polymérase du phage T4 (Biolabs) utilisée selon les recommandations du fabricant. La destruction des extrémités 5' proéminentes est effectuée par un traitement ménagé par la nucléase S1.

La mutagenèse dirigée in vitro par oligodéoxynucléotides synthétiques peut être effectuée selon la méthode développée par Taylor et al. [Nucleic Acids Res. 13 (1985) 8749-8764] en utilisant le kit distribué par Amersham.

L'amplification enzymatique de fragments d'ADN par la technique dite de PCR [Polymérase-catalyzed Chain Reaction, Saiki R.K. et al., Science 230 (1985) 1350-1354; Mullis K.B. et Faloona F.A., Meth. Enzym. 155 (1987) 335-350] peut être effectuée en utilisant un "DNA thermal cycler" (Perkin Elmer Cetus) selon les spécifications du fabricant.

La vérification des séquences nucléotidiques peut être effectuée par la méthode développée par Sanger et al. [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74 (1977) 5463-5467].

Exemples

Exemple 1. Construction du vecteur pSh-Ad-APP695.

Cet exemple décrit la construction d'un vecteur comprenant une séquence d'ADN codant pour le précurseur du peptide amyloïde APP695 sous le contrôle d'un promoteur constitué par le LTR du virus du sarcome de rous (LTR-RSV).

1.1. Vecteurs de départ :

- Vecteur pXL2244 : Le plasmide pXL2244 contient l'ADNc de l'ApoAI sous le contrôle du promoteur LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 (figure 1). Il a été construit par insertion d'un fragment ClaI-EcoRV contenant l'ADNc codant pour la préproApoAI dans le vecteur pLTR RSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90 (1992) 626), digéré par les mêmes enzymes.

- Vecteur pSVK3 APP695 : Ce vecteur contient une séquence codant pour l'isoforme 695 du précurseur du peptide amyloïde (fourni par le Dr. J.N. Octave) (Kang et al. précitée).

1.2. Construction du vecteur pSh-Ad-APP695

Cet exemple décrit la construction du vecteur pSh-Ad-APP695 contenant la séquence codant pour l'isoforme 695 du précurseur du peptide amyloïde sous contrôle du LTR du virus RSV, ainsi que des séquences de l'adénovirus Ad5 permettant la recombinaison in vivo.

Le vecteur pSVK3 APP695 a été digéré par les enzymes EcoRV et Sall. Le fragment EcoRV-Sall de 2 kb contenant la séquence codant pour l'isoforme 695 du précurseur du peptide amyloïde a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP ("Low Melting Point"). Parallèlement, le vecteur pXL2244 a été traité par l'enzyme de restriction ClaI (site en position 1089 sur la figure 1). Les extrémités ont ensuite été rendues franches par traitement en présence du fragment klenow de l'ADN polymérase. Le vecteur a ensuite été digéré par l'enzyme Sall (site en position 1930 sur la figure 1). Le vecteur linéaire de 7 kb résultant a ensuite été isolé et purifié par électrophorèse sur un gel d'agarose LMP. Les fragments de 2 et 7 kb ainsi obtenus ont ensuite été ligaturés pour générer le vecteur pSh-Ad-APP695 (figure 2).

Exemple 2. Fonctionnalité du vecteur pSh-Ad-APP695

La capacité du vecteur pSh-Ad-APP695 à exprimer sur culture cellulaire l'isoforme 695 de l'APP a été démontrée par transfection transitoire de cellules COS1. Pour cela, les cellules (10^6 cellules par boîte de 10 cm de diamètre) ont été
5 transfectées (8 μ g de vecteur) en présence de Transfectam. Après 72 heures, les protéines totales et sécrétées ont été analysées en western blot. A cet effet, les protéines sont séparées selon leur masse par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. La présence
10 d'APP est ensuite confirmée par réaction immunologique selon la méthode ECL (Amersham) en utilisant l'anticorps spécifique 22C11 (Boehringer).

Exemple 3. Construction de l'adénovirus Ad-APP695

Le vecteur pSh-Ad-APP695 a été linéarisé et cotransfecté avec un vecteur adénoviral déficient, dans les cellules helper (lignée 293) apportant en *trans* les fonctions codées par les régions E1 (E1A et E1B) d'adénovirus.

15 Plus précisément, l'adénovirus Ad-APP695 a été obtenu par recombinaison homologue *in vivo* entre l'adénovirus mutant Ad-dl1324 (Thimmappaya et al., Cell 31 (1982) 543) et le vecteur pSh-Ad-APP695, selon le protocole suivant : le plasmide pSh-Ad-APP695 et l'adénovirus Ad-dl1324, linéarisé par l'enzyme ClaI, ont été co-
20 transfectés dans la lignée 293 en présence de phosphate de calcium, pour permettre la recombinaison homologue. Les adénovirus recombinants ainsi générés ont été sélectionnés par purification sur plaque. Après isolement, l'ADN de l'adénovirus recombinant a été amplifié dans la lignée cellulaire 293, ce qui conduit à un surnageant de culture contenant l'adénovirus défectif recombinant non purifié ayant un titre
25 d'environ 10^{10} pfu/ml.

Les particules virales sont ensuite purifiées par centrifugation sur gradient de chlorure de césium selon les techniques connues (voir notamment Graham et al., Virology 52 (1973) 456). L'adénovirus Ad-APP695 peut être conservé à -80°C dans
20 % de glycérol.

Exemple 4. Fonctionnalité de l'adénovirus Ad-APP695

30 La capacité de l'adénovirus Ad-APP695 à exprimer sur culture cellulaire l'isoforme 695 de l'APP a été démontrée par infection des cellules de la lignée 293. La

présence d'APP dans les cellules a ensuite été déterminée dans les mêmes conditions que dans l'exemple 2.

Ces études permettent de montrer que l'adénovirus exprime bien le variant 695 de l'APP en culture cellulaire.

5 Exemple 5. Construction d'un modèle animal

Cet exemple décrit la construction d'un modèle animal de la maladie d'Alzheimer contenant un adénovirus capable d'exprimer le variant 695 de l'APP.

L'adénovirus préparé dans l'exemple 3 est utilisé sous forme purifiée ($3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l), dans une solution saline phosphate (PBS).

10 Les animaux, préalablement anesthésiés, sont préparés par injections directes dans le système nerveux central et, plus précisément, au niveau de l'hippocampe et du cortex entorhinal. Les injections sont réalisées à l'aide d'une canule (diamètre extérieur 280 μ m) connectée à une pompe. La vitesse d'injection est fixée à 0,5 μ l/min, après quoi, la canule reste en place pendant 4 minutes supplémentaires avant d'être
15 remontée. Le volume d'injection dans l'hippocampe et le cortex entorhinal est de 1 μ l. La dose d'adénovirus injectée est de $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l.

Pour l'injection dans l'hippocampe, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-2,0; ML=1,5; V=-2,5 (les coordonnées AP et ML sont déterminées par rapport au bregma, la coordonnée V par rapport à la surface de l'os crânien au
20 niveau du bregma.

Pour l'injection dans le cortex entorhinal, les coordonnées stéréotaxiques sont les suivantes : AP=-3,5; ML=3,5; V=-3,7.

Les injections suivantes sont réalisées :

- 11 souris C57Bl/6 mâles, âgées de 2 mois, sont injectées avec $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l d'adénovirus ad-APP et 4 avec $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l d'adénovirus ad-APP + $3,5 \cdot 10^5$ pfu/ μ l d'adénovirus ad- β Gal (Le Gal La Salle et al., Science 259 (1993) 988).
25

- 5 souris C57Bl/6 mâles, âgées de 2 mois, sont injectées avec $3,5 \cdot 10^6$ pfu/ μ l d'adénovirus ad- β Gal.

Analyse histologique

30 Au cours du temps (7, 15, 30 et 60 jours après l'injection) la surexpression de l'APP695 au niveau du site d'injection intracérébral est analysée par immunohistologie.

Les animaux sont sacrifiés, sous anesthésie, par perfusion intracardiaque de 4% paraformaldéhyde. Après prélèvement et post-fixation (2 heures), le cerveau est coupé au cryomat : des coupes de 40 µm d'épaisseur sont recueillies dans du tampon. Ces coupes flottantes sont ensuite traitées pour la révélation immunohistologique de l'APP695 par un anticorps spécifique 22C11 (Boehringer) (méthode de streptavidine-biotine peroxydase).

En plus de l'analyse histologique démontrant la surexpression de l'APP695, les animaux de l'invention permettent de mettre en évidence l'incidence de cette surexpression sur le développement de pathologies cérébrales liées à la maladie d'Alzheimer, comme la présence de protéine β-amyloïde en dépôts diffus ou en plaques, la présence de dégénérescence neurofibrillaires et de plaques neuritiques, ou encore des pertes neuronales et synaptiques. Comme pour l'APP695, la présence de bêta-A4, PHF, Ubiquitine et GFAP est déterminée par immunohistologie. Dans ce cas, l'immunohistologie est réalisée sur coupes en paraffine, le cerveau ayant été préalablement deshydraté et inclu en paraffine.

Analyse comportementale

Les animaux de l'invention permettent également de mettre en évidence l'incidence de la surexpression d'APP695 sur le comportement, et en particulier, sur les processus mnésiques. A cet égard, le test de la piscine (R. Morris, J. Neurosc. Meth. 11 (1984) 47) permet de mesurer l'effet de l'injection de l'adéno-APP, et éventuellement d'un composé ou d'une composition à tester, sur certains de ces processus.

REVENDICATIONS

1. Adénovirus recombinant défectif comprenant une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde.
2. Adénovirus selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il est dépourvu des
5 régions de son génome qui sont nécessaires à sa réplication dans la cellule cible.
3. Adénovirus selon la revendication 2 caractérisé en ce qu'il s'agit d'un adénovirus humain de type Ad2 ou Ad5 ou canin de type CAV-2.
4. Adénovirus selon l'une des revendications 1 à 3 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue code pour tout variant naturel ou synthétique de l'APP.
- 10 5. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue code pour l'APP695, l'APP751 ou l'APP770.
6. Adénovirus selon la revendication 4 caractérisé en ce que la séquence d'ADN hétérologue code pour le précurseur du peptide amyloïde tronqué dans sa région N-terminale.
- 15 7. Adénovirus selon l'une des revendications précédentes caractérisé en ce que la séquence d'ADN est placée sous le contrôle de signaux d'expression permettant son expression dans le système nerveux d'un animal, choisis de préférence parmi les promoteurs d'origine virale.
8. Adénovirus selon la revendication 7 caractérisé en ce que les signaux
20 d'expression sont choisis parmi les promoteurs E1A, MLP, CMV et LTR-RSV.
9. Adénovirus recombinant défectif caractérisé en ce qu'il comprend une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde sous contrôle du LTR-RSV.
10. Utilisation d'un adénovirus selon l'une des revendications 1 à 9 pour la
25 préparation d'un modèle animal de la maladie d'Alzheimer.
11. Modèle animal de la maladie d'Alzheimer caractérisé en ce qu'il s'agit d'un mammifère non-humain contenant un adénovirus recombinant selon l'une des revendications 1 à 9.

12. Modèle animal selon la revendication 11 caractérisé en ce que l'adénovirus recombinant est administré par injection.

13. Modèle animal selon la revendication 12 caractérisé en ce que l'adénovirus recombinant est administré par injection dans le système nerveux central.

5 14. Modèle animal selon la revendication 13 caractérisé en ce que l'adénovirus recombinant est administré par injection dans le système nerveux central au moyen d'un appareil d'injection stéréotaxique.

15 15. Modèle animal selon l'une des revendications 11 à 14 caractérisé en ce que l'adénovirus recombinant est administré à un animal âgé de 1 à 25 semaines, et de préférence, de 4 à 20 semaines.

16. Modèle animal selon l'une des revendications 11 à 15 caractérisé en ce que l'adénovirus recombinant est administré sous forme d'une solution stérile partiellement purifiée.

15 17. Modèle animal selon l'une des revendications 11 à 16 caractérisé en ce que le mammifère non-humain est choisi parmi les rongeurs.

18. Modèle animal selon la revendication 17 caractérisé en ce qu'il s'agit d'une souris, d'un rat, d'un cobaye, d'un lémurien ou d'un lapin.

20 19. Procédé de préparation d'un modèle animal de la maladie d'Alzheimer caractérisé en ce que l'on administre, à un mammifère non-humain, un adénovirus recombinant comprenant une séquence d'ADN codant pour une forme du précurseur du peptide amyloïde.

25 20. Procédé de mise en évidence de composés ou compositions actifs vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer caractérisé en ce que l'on administre ledit composé ou ladite composition à un animal selon l'une des revendications 11 à 18, et on détermine son activité sur l'effet induit par l'adénovirus recombinant.

21. Procédé selon la revendication 20 caractérisé en ce que le composé ou la composition sont administrés par voie orale, topique, parentérale, intranasale, intraveineuse, intramusculaire, sous-cutanée, intraoculaire ou transdermique.

22. Composé actif vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer, obtenu par le procédé selon les revendications 20 à 21.

23. Composition active vis-à-vis de la maladie d'Alzheimer, obtenue par le procédé selon les revendications 20 à 21.

1/2

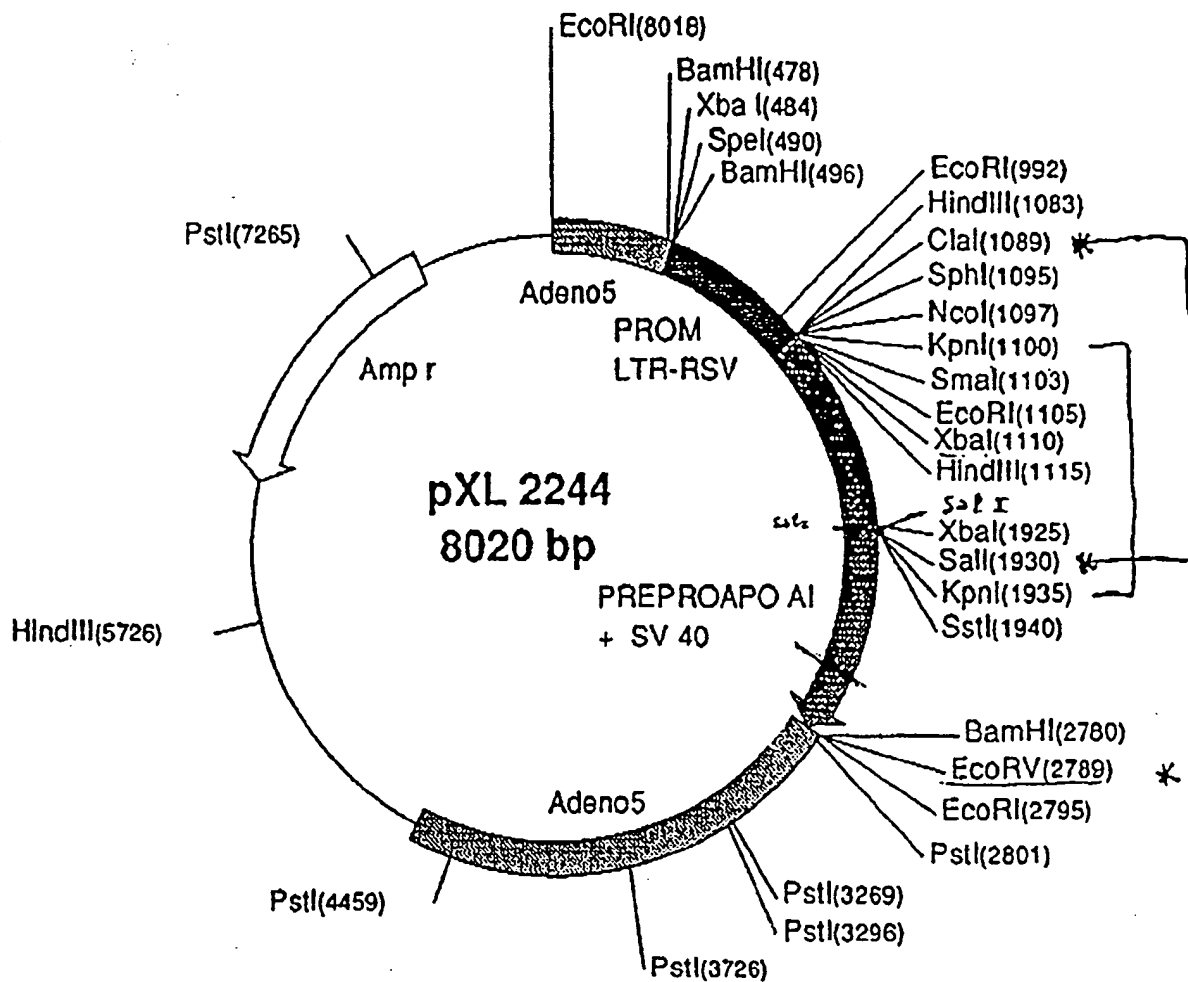


FIGURE 1

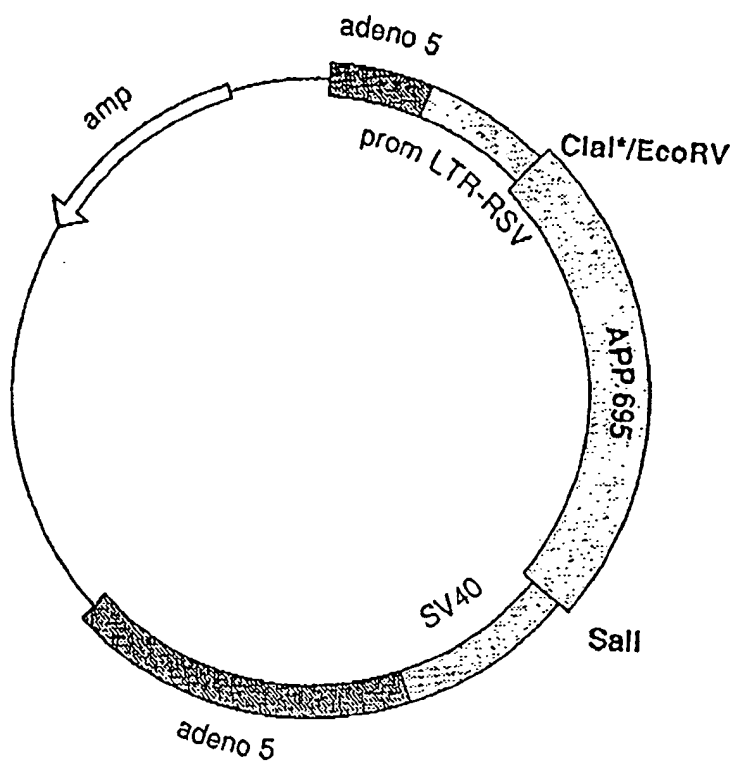


FIGURE 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/Fr 95/00187

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 A01K67/027 C07K14/47 C12N15/12 C12N7/02
G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 A01K C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO,A,93 14200 (TSI CORPORATION) 22 July 1993 see the whole document ---	1
A	EP,A,0 451 700 (MILES INC.) 16 October 1991 see the whole document ---	1
A	WO,A,91 09120 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 27 June 1991 see the whole document ---	1
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 1995

Date of mailing of the international search report

0 6. 06. 95

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Chambonnet, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/Fr 95/00187

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' see the whole document ---	1
P,A	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 April 1994 see claims ---	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.90, August 1993, WASHINGTON US pages 7024 - 7028 CARUSO, M. ET AL. 'Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene' see the whole document -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/Fr 95/00187

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date	
WO-A-9314200		22-07-93		AU-B-	3336093	03-08-93	
				CA-A-	2127450	22-07-93	
				EP-A-	0620849	26-10-94	
EP-A-0451700		16-10-91		CA-A-	2040077	11-10-91	
				JP-A-	7067650	14-03-95	
WO-A-9109120		27-06-91		AU-A-	6919691	18-07-91	
				EP-A-	0504244	23-09-92	
WO-A-9408026		14-04-94		AU-B-	4818093	26-04-94	
				NO-A-	951121	23-03-95	

Demande Internationale No
PCT/Fr. 95/00187

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 6 C12N15/86 A01K67/027 C07K14/47 C12N15/12 C12N7/02 G01N33/50		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE		
Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 6 A01K C07K C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,93 14200 (TSI CORPORATION) 22 Juillet 1993 voir le document en entier ---	1
A	EP,A,0 451 700 (MILES INC.) 16 Octobre 1991 voir le document en entier ---	1
A	WO,A,91 09120 (MEDICAL RESEARCH COUNCIL) 27 Juin 1991 voir le document en entier ---	1
-/--		
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="width: 45%;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents </div> <div style="width: 45%;"> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div> </div>		
* Catégories spéciales de documents cités:		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>*A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>*E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>*L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>*O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>*P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>*X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>*Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>*&* document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center; font-weight: bold;">19 Mai 1995</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center; font-weight: bold;">0 6. 06. 95</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Chambonnet, F</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/Fr 95/00187

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	NOUVELLE REVUE FRANCAISE D'HEMATOLOGIE, vol.35, no.3, 1993 pages 299 - 300 PESCHANSKI, M. ET AL. 'Transfert de gènes à but thérapeutique dans le système nerveux central' voir le document en entier ---	1
P,A	WO,A,94 08026 (CNRS) 14 Avril 1994 voir revendications ---	1
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA., vol.90, Août 1993, WASHINGTON US pages 7024 - 7028 CARUSO, M. ET AL. 'Regression of established macroscopic liver metastases after in situ transduction of a suicide gene' voir le document en entier -----	1

Formulaire PCT/ISA/210 (suite de la deuxième feuille) (juillet 1992)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale No

PCT/Fr 95/00187

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9314200	22-07-93	AU-B- 3336093	03-08-93
		CA-A- 2127450	22-07-93
		EP-A- 0620849	26-10-94

EP-A-0451700	16-10-91	CA-A- 2040077	11-10-91
		JP-A- 7067650	14-03-95

WO-A-9109120	27-06-91	AU-A- 6919691	18-07-91
		EP-A- 0504244	23-09-92

WO-A-9408026	14-04-94	AU-B- 4818093	26-04-94
		NO-A- 951121	23-03-95

1/2.

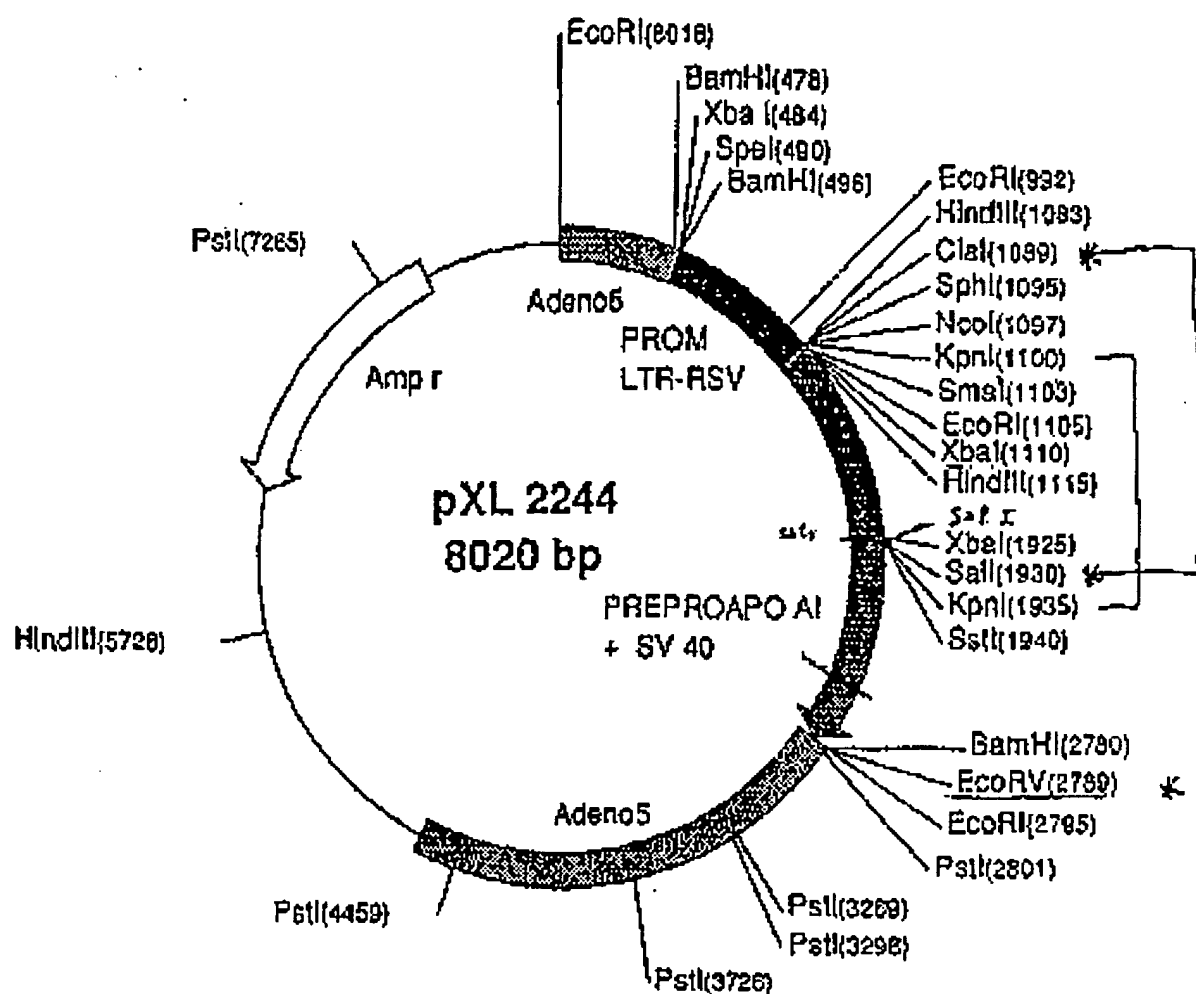


FIGURE 1

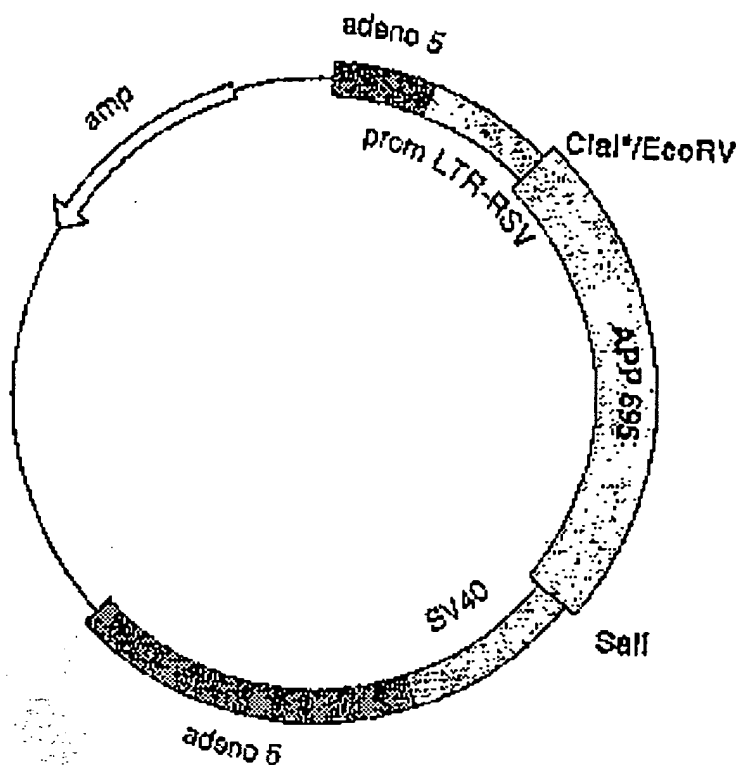


FIGURE 2